

Resultados preliminares do efeito da aplicação de um extrato de algas em oliveiras ‘Cobrançosa’ e ‘Galega’

M. Mota* & J.P.S. Lopes

CEER – Biosystems Engineering/Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal; *mariana@isa.utl.pt

Resumo

Recentemente, têm surgido à disposição dos agricultores produtos ditos bioestimulantes, destinados a melhorar a eficiência de absorção de nutrientes e a "performance" das culturas, nomeadamente o vingamento dos frutos. Procurou-se neste trabalho abordar o efeito da aplicação de um bioestimulante à base de um extracto da alga *Ascophyllum nodosum* (Goëmar Olivos (Selectis)) no vingamento e no metabolismo do azoto em oliveiras ‘Galega’ e ‘Cobrançosa’. Contabilizou-se o número de frutos vingados 25 dias após o início da floração e avaliou-se a actividade das enzimas nitrato-redutase e glutamina-sintetase, enzimas chave do metabolismo do azoto, em folhas e estruturas reprodutivas colhidas periodicamente durante as semanas da floração e formação do fruto.

A aplicação do bioestimulante beneficiou significativamente o vingamento na ‘Galega’, não tendo efeito visível na ‘Cobrançosa’, cultivar menos vigorosa. Estes resultados podem estar relacionados com uma eventual maior resistência ao desprendimento do fruto por parte da ‘Galega’ que na ‘Cobrançosa’, diferença que pode ter sido crucial no momento de segurar os jovens-frutos na árvore aquando da forte precipitação e vento registados nas semanas seguintes à floração. Inversamente, a actividade enzimática dos órgãos reprodutivos da ‘Cobrançosa’ foi influenciada positivamente pelo bioestimulante, não se verificando acção benéfica no caso da ‘Galega’. A maior expressão do efeito da aplicação do bioestimulante sobre a actividade enzimática nos órgãos reprodutivos e em árvores em condições sub-óptimas, sugere que nestas condições o produto poderá ter um efeito mais positivo sobre a cultura, nomeadamente, no aumento da eficiência de utilização de nutrientes (como foi o caso da ‘Cobrançosa’).

É de salientar, no entanto, que na primavera de 2011, quando este ensaio se realizou, ocorreram chuvas intensas acompanhadas de vento forte durante a floração, o que pode ter influenciado fortemente os resultados obtidos, não sendo também de ignorar o contributo próprio de cada genótipo.

Palavras-chave: *Olea europaea* L., vingamento, nitrato-redutase, glutamina-sintetase, bioestimulante.

Abstract

Preliminary results of seaweed extract application on olive trees ‘Cobrançosa’ and ‘Galega’.

Recently, new products designated as biostimulants have become available to farmers, aiming an improvement of the nutrient use and crop performance, namely in fruit set. The application of a seaweed based biostimulant was studied in olive trees

'Galega' and 'Cobrançosa'. The field trial was conducted in an olive orchard near Santarém (Portugal) and biostimulant action was analysed in terms of fruit set and activity of enzymes involved in nitrogen metabolism (nitrate reductase and glutamine synthetase) in leaves and in reproductive organs sampled periodically during flowering and fruit formation. Results showed that the biostimulant application significantly improved fruit set in 'Galega' and the enzymatic activity in reproductive organs of 'Cobrançosa'. It was concluded that the biostimulant effect on enzymatic activity was more expressive in the reproductive organs and in trees grown under suboptimal conditions. These results suggest that in these conditions, the biostimulant may have a stronger beneficial effect on the crop, namely on the nutrient use efficiency (as it happened in 'Cobrançosa').

However, it is noteworthy that, during spring 2011, when this trial was conducted, heavy rains and strong winds occurred, that might have influenced the results obtained. The contribution of each genotype cannot also be underestimated.

Keywords: *Olea europaea* L., fruit set, nitrate reductase, glutamine synthetase, biostimulant.

Introdução

A cultura da oliveira tem tido uma expansão muito importante no nosso país nos últimos anos, reforçando o interesse de estudos que contribuam para o aumento da sua produtividade. Estes estudos têm incidido essencialmente sobre o azeite e a azeitona de mesa, mas são necessários também estudos sobre os factores que determinam o rendimento no olival. Entre outros factores, a polinização e o estado nutricional das plantas são duas fortes condicionantes no que respeita ao número de frutos vingados e, como tal, à produção final.

Recentemente, têm surgido à disposição dos agricultores produtos ditos bioestimulantes, destinados a melhorar a eficiência de absorção de nutrientes e a "performance" das culturas. Os bioestimulantes constituídos à base de extratos de algas têm sido usados em várias culturas, sendo-lhes atribuído um efeito benéfico sobre o estado nutricional das plantas e o vingamento dos frutos. O produto Goëmar Olivos, à base de creme da alga *Ascophyllum nodosum*, veicula nutrientes como boro, magnésio na forma de MgO, enxofre na forma de SO₃ e azoto. Segundo o fabricante, o Goëmar Olivos é um creme de algas GA 14 de origem natural que fornece diversos fisio-activadores fundamentais no metabolismo da oliveira, através da melhoria na absorção dos nutrientes pelas raízes, estímulo na migração dos nutrientes para os locais de crescimento e também no aumento da síntese natural de poliaminas favorecendo o processo de floração e vingamento. A utilização de Goëmar Olivos permite melhorar o processo de floração, fecundação e vingamento na oliveira, possibilitando melhores rendimentos resultantes do aumento de produção. Segundo os fabricantes, este produto melhora a actividade enzimática de enzimas chave na assimilação de um nutriente importantíssimo para todas as plantas, o azoto (N), atuando directamente sobre a enzima nitrato-redutase (NR).

Neste contexto, procurou-se com este trabalho abordar a influência da aplicação do bioestimulante Goëmar Olivos (Selectis) sobre o vingamento e o metabolismo do azoto na cultura da oliveira, cultivares Galega e Cobrançosa.

Material e Métodos

O ensaio de campo foi realizado numa exploração agrícola na região de Santarém, a Quinta da Choufarra. As plantas escolhidas para o ensaio foram exemplares de plantas de origem clonal obtidas na própria exploração, em plena produção, com 11 anos ordenadas num espaçamento de 6×7 m. Trata-se de um olival de regadio por sistema gota-a-gota em modo de protecção integrada. Foram seleccionadas 20 árvores por cultivar ('Galega' e 'Cobrançosa'), número que foi dividido por dois tratamentos, 10 árvores onde foi aplicado o bioestimulante e 10 sem a aplicação. No total foram utilizadas 40 árvores. O produto utilizado neste ensaio foi um bioestimulante à base de um creme de algas enriquecido com magnésio (37 g/l de MgO), boro (26 g/l), enxofre na forma solúvel (73 g/l SO₃) e azoto (41 g/l). A sua aplicação foi feita por via foliar em duas fases, com um pulverizador de costas numa concentração de 300 ml/hl. A primeira aplicação ocorreu quando as planta já se encontrava a desenvolver as peças florais (estado 53 da escala de desenvolvimento fenológico da oliveira BBCH). A segunda fase de aplicação ocorreu cerca de duas semanas depois, no dia 18 de abril, altura correta para a sua aplicação. Para os ensaios enzimáticos foram recolhidas amostras de folhas e de estruturas reprodutivas com uma periodicidade de cerca de uma semana (desde 4 de maio a 12 de junho de 2011). A primeira e última colheita correspondem aos estados fenológicos 60 e 79 respectivamente, da escala BBCH da oliveira elaborada por Sanz-Cortés et al. (2002). O método de colheita das amostras foi feito segundo as normas de colheita de culturas arbóreas divulgado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária. As amostras foram recolhidas e mantidas em fresco no percurso até ao laboratório, no qual se procedia à pesagem e ao congelamento com azoto líquido. Todas as amostras foram mantidas a -80°C. As contagens de frutos vingados foram feitas em 100 inflorescências de cada cultivar e modalidade (10 inflorescências/árvore, contagens em 10 árvores), em polinização livre. As inflorescências foram seleccionadas nos quatro quadrantes da árvore.

Ensaio Enzimáticos

O extracto de reacção foi preparado moendo as folhas/peças florais em azoto líquido (cerca de 350 mg no caso das flores, 220 mg para as flores/frutos) e ressuspendendo o tecido em 1 ml de solução tampão (Liu et al., 2008) e 7,5 µl de antioxidante β-mercaptoetanol. Posteriormente, o material foi sujeito a duas centrifugações a uma temperatura de 4°C, a primeira durante 5 minutos a 3000 rpm e segunda durante 20 minutos a 15000 rpm. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo até que se chegou ao extrato final que era conservado a -20°C. Tanto a actividade da enzima nitrato-redutase como a da glutamina-sintetase foram reportadas ao teor total de proteínas solúveis existentes na solução.

As proteínas totais foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Os ensaios enzimáticos para a determinação da NR foram realizados com base no protocolo descrito por Kaiser e Lewis (1984), incubando a reacção a 28°C durante 18 horas. O nitrito formado foi detectado colorimetricamente a 540 nm depois do azo-acoplamento com a sulfanilamida e o dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. Cada determinação da actividade de NR foi feita em triplicado e a actividade enzimática foi expressa em µmol NO₂⁻ formado por mg de proteína total. A determinação da actividade da GS foi

realizada com base no método descrito pelos mesmos autores da NR (Kaiser & Lewis, 1984). A curva padrão foi levada a cabo usando como substrato alternativo ao NH_4^+ a hidroxilamina e o produto da reacção, o glutamil-hidroxamato. A sua detecção foi realizada por espectrofotometria a uma absorvância de 500 nm depois de uma centrifugação a 8000 rpm durante 5 minutos. Os resultados obtidos são expressos em μmol glutamil-hidroxamato por mg de proteína total.

Os resultados das actividades enzimáticas bem como do vingamento dos frutos foram tratados estatisticamente usando o software Statistix 9 a um nível de significância $\alpha = 0,05$. O tratamento foi realizado separadamente nas duas cultivares. No que se refere aos ensaios enzimáticos foram feitas análises de variância para cada uma das datas comparando para cada cultivar e tipo de órgão, as modalidades com e sem bioestimulante, e em cada órgão foram testadas as diferenças entre os tratamentos, com ou sem bioestimulante, ao longo do período estudado. Nos casos em que se verificaram diferenças significativas nas análises de variância ($p\text{-value} \leq 0,05$) procedeu-se ao teste de Tukey de modo a realizar-se uma comparação de médias.

Resultados e Discussão

Vingamento

Os resultados relativos à contagem do número de frutos vingados em polinização livre em 10 inflorescências por árvore num total de 20 árvores por cultivar (das quais a 10 tinha sido aplicado o bioestimulante e a outras 10 não), encontram-se no quadro 1. A análise de variância realizada à contagem de frutos das duas cultivares, considerando 10 árvores por modalidade, revelou que apenas se registaram diferenças significativas para a cultivar Galega ($p=0,0412$), sendo a modalidade com bioestimulante a que apresenta valores significativamente superiores. No caso da 'Cobrançosa', menos vigorosa e em que houve menor número de frutos vingados, o $p\text{-value}$ resultante foi 0,1363 indicando que não existe diferença significativa entre árvores com ou sem bioestimulante ($\alpha=0,05$). Estes resultados podem estar relacionados com a resistência ao desprendimento do fruto, a 'Galega' parece ter um poder superior de resistência à queda do fruto que a cultivar Cobrançosa. Esta diferença pode ter sido crucial no momento de segurar os jovens frutos na árvore aquando da forte precipitação e vento registados nas semanas seguintes à floração.

Ensaio enzimáticos

As actividades enzimáticas medidas em folhas e órgãos reprodutivos com e sem Goëmar colhidos em 5 datas diferentes ilustram-se nas fig. 1, 2, 3 e 4. Por lapso, não há valores referentes à primeira data para a amostra de folhas de 'Cobrançosa' sem bioestimulante, devido ao desaparecimento da mesma. Realça-se que, na quarta data de colheita, houve um aumento significativo da actividade das enzimas. Para o caso da GS, na 'Cobrançosa', a comparação das amostras foliares das duas modalidades nas diferentes datas só revelou diferenças significativas para a 3.ª data, em que a modalidade tratada com bioestimulante apresentou uma actividade enzimática significativamente superior à outra. No caso das amostras derivadas dos órgãos reprodutivos, verifica-se que a amostra correspondente à aplicação de bioestimulante apresenta actividades enzimáticas tendencialmente superiores, surgindo diferenças significativas nas datas 2, 3 e 4, sendo estas a favor da modalidade onde o

bioestimulante foi aplicado nas datas 3 e 4 ($p=0,0089$; $0,0192$; $0,002$ respectivamente). Quando feita a análise da actividade enzimática da GS ao longo do tempo para cada uma das amostras, verificou-se em todas as amostras que a 4.^a data apresentava valores significativamente superiores aos obtidos para as restantes datas.

No caso da NR, a comparação das amostras foliares não revelou nenhuma tendência clara, na medida em que surgem diferenças significativas na 3.^a e na 5.^a datas, surgindo com maior actividade na 3.^a data a amostra sem bioestimulante, e com maior atividade na 5.^a data a amostra com Goëmar. Em relação às amostras derivadas das peças florais/pequenos frutos, à semelhança do que se observara com a GS, verifica-se que a amostra com bioestimulante apresenta actividades enzimáticas tendencialmente superiores, surgindo diferenças significativas nas datas 3, 4 e 5 ($p=0,0342$; $0,0433$; $0,0002$ respectivamente). A análise da actividade da NR para cada uma das amostras, ao longo do tempo, revela também algumas diferenças significativas. No caso da amostra foliar com bioestimulante, verifica-se que à 5.^a data a actividade de NR doseada é significativamente superior à das outras datas. Em relação às peças reprodutivas, a actividade doseada na 1.^a data é significativamente superior aquela que foi aferida às 4.^a e 2.^a (por esta ordem) datas e estas por sua vez são significativamente superiores às actividades medidas nas 3.^a e 5.^a datas.

Em relação à cultivar Galega, analisando a GS, verifica-se que não há uma tendência clara nem no comportamento das amostras foliares (à 1.^a data a amostra sem bioestimulante apresenta uma actividade significativamente superior à da amostra com Goëmar, invertendo-se este comportamento nas 3.^a e 5.^a datas) nem no das amostras das estruturas reprodutivas (à 2.^a e 5.^a datas, tem maior actividade a amostra com bioestimulante e à 3.^a e 4.^a datas tem maior actividade a amostra sem bioestimulante). Analisando a actividade da GS para cada amostra ao longo do tempo, verifica-se a ocorrência de um comportamento semelhante ao descrito para a 'Cobrançosa', isto é, observa-se que a 4.^a data apresentou valores significativamente superiores aos obtidos para as restantes datas. Em relação à NR, não se observou uma tendência clara, numa data a actividade de NR é significativamente superior na amostra foliar com bioestimulante mas inferior na amostra das peças reprodutivas com bioestimulante (3.^a data), noutra data é significativamente superior na amostra de peças reprodutivas sem bioestimulante (5.^a data). O estudo da actividade da NR ao longo do tempo revelou que nas amostras foliares não havia diferenças significativas entre datas, mas que estas surgiam nas amostras das estruturas reprodutivas, tanto nas amostras com bioestimulante como nas sem bioestimulante. Aqui, em ambos os casos, se verificou maior actividade da NR na primeira data.

A influência positiva do extracto de algas sobre a actividade enzimática dos órgãos reprodutivos da 'Cobrançosa', não se verificando acção benéfica no caso da 'Galega', traduz uma maior expressão do efeito da aplicação do bioestimulante sobre a actividade enzimática nos órgãos reprodutivos e em árvores em condições subótimas. O facto das enzimas GS e NR mostarem um comportamento diferente entre elas pode também estar relacionado com o plano de fertilização da exploração. Este compreende uma adubação azotada na forma de ureia desde o início vegetativo até à floração. Deste modo, a enzima GS tem à sua disposição para catalisar o N proveniente não só da actividade da NR como também do N em forma não nítrica disponibilizado por este tipo de adubo.

É de salientar, no entanto, que em 2011, quando este ensaio se realizou, se verificou a ocorrência de chuvas intensas acompanhadas de vento forte na época da floração, o que pode ter influenciado fortemente os resultados obtidos, não sendo também de ignorar o contributo próprio de cada genótipo. Este ensaio está a ser continuado em 2012, procurando esclarecer de forma mais conclusiva os efeitos do bioestimulante e, também, em que medida é que o genótipo pode modular a acção deste composto.

Conclusões

Os ensaios da aplicação do bioestimulante Goëmar Olivos sugerem que, em condições subóptimas de produção, o produto poderá ter um efeito mais positivo sobre a cultura nomeadamente no aumento da eficiência de utilização de nutrientes (como foi o caso da 'Cobrançosa'). Conclui-se que, e à semelhança do que acontece nas fertilizações, as árvores debilitadas são aquelas que respondem melhor enzimaticamente à aplicação do produto, não abandonando a hipótese da influência do património genético. O facto de se ter registado um aumento significativo para o vingamento na cultivar Galega para a modalidade com aplicação do bioestimulante e de este não ter sido acompanhado por aumento da actividade enzimática, sugere que o produto induz nas plantas outros factores envolvidos no vingamento de frutos (possivelmente ao nível hormonal, uma vez que o produto promove a síntese de poliaminas).

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Engenheiro Rui Soares Lopes, da Soares Lopes–Casa Agrícola, que nos cedeu o seu olival para a realização dos ensaios de campo, e da Selectis, que gentilmente disponibilizou o produto Goëmar Olivos para a realização do estudo.

Referências

- Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*.
- Kaiser, J & Lewis, O. 1984. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L.. *Plant and Soil*, 70:127-130.
- Liu, X.Q., Ko, K.Y., Kim, S.H. & Lee, K.S. 2008. Effect of Amino Acid Fertilization on Nitrate Assimilation of leafy radish and soil chemical properties in high nitrate soil. *Soil and Plant Analysis*, 39:269-281.
- Sanz-Cortés, F., Martínez-Calvo, J., Badenes, M., Bleiholder, H., Hack, H., Llácer, G. & Meier, U. 2002. Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Association of Applied Biologists*, 140:151-157.

Quadro 1 -,Número de frutos vingados registados nas diferentes modalidades.

	Cobrançosa		Galega	
	Com bioestimulante	Sem bioestimulante	Com bioestimulante	Sem bioestimulante
Total	125	119	172	154
Máximo	3	3	5	5
Mínimo	1	1	1	1
Média	1,25	1,19	1,72	1,54

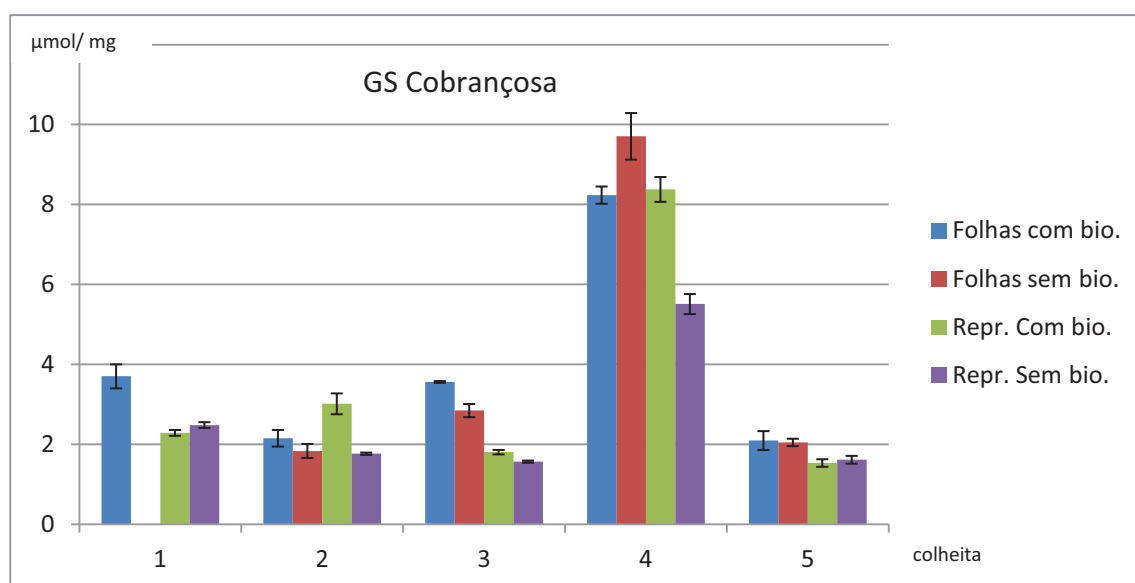


Figura 1 - Atividade média da enzima GS nos diferentes órgãos ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=3). Legenda: Folhas com bio. – folhas com bioestimulante aplicado; Folhas sem bio. - Folhas sem bioestimulante aplicado; Repr. Com bio. – estruturas reprodutivas com bioestimulante aplicado; Repr. Sem Bio. – estruturas sem bioestimulante aplicado.

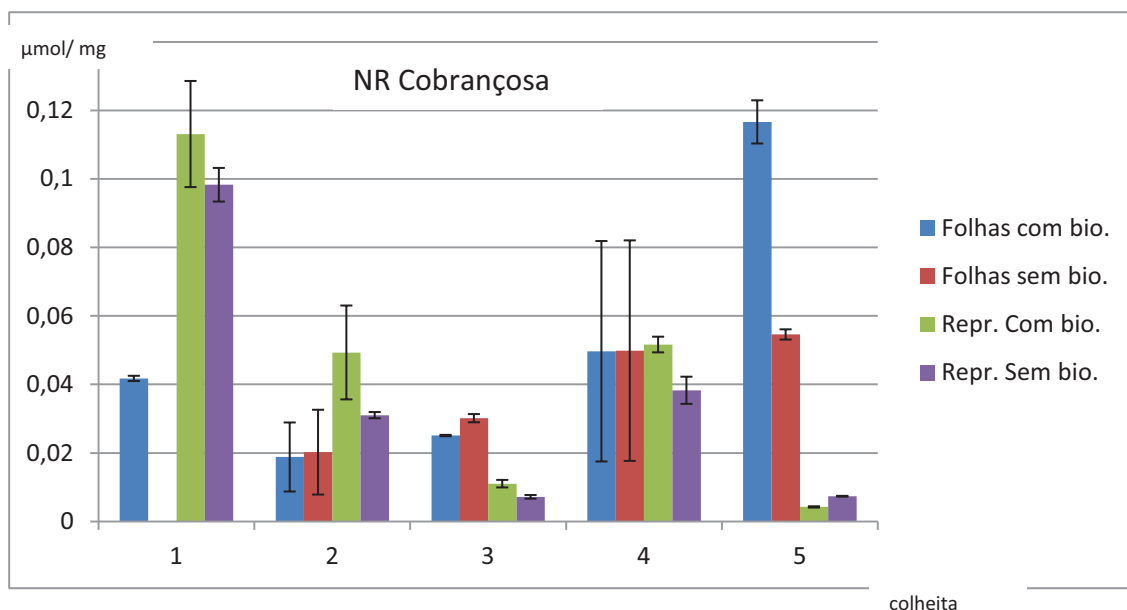


Figura 1 - Atividade média da enzima NR nos diferentes órgãos ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=3). Legenda: Folhas com bio. – folhas com bioestimulante aplicado; Folhas sem bio. - Folhas sem bioestimulante aplicado; Repr. Com bio. – estruturas reprodutivas com bioestimulante aplicado; Repr. Sem Bio. – estruturas sem bioestimulante aplicado.

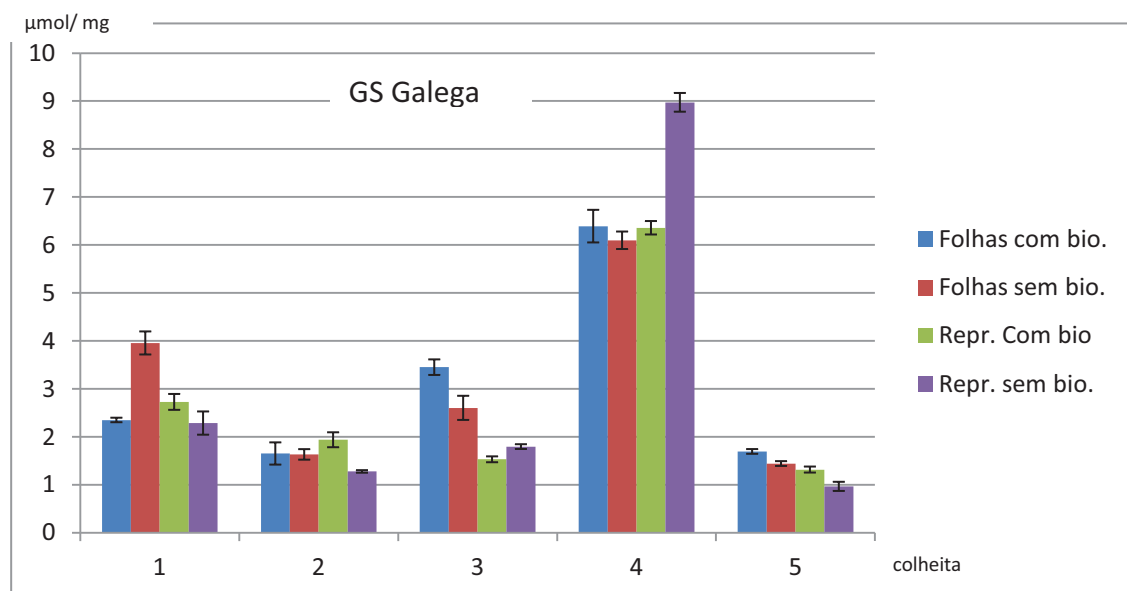


Figura 3 - Atividade média da enzima NR nos diferentes órgãos ao longo do período estudado para a cultivar Galega. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=3). Legenda: Folhas com bio. – folhas com bioestimulante aplicado; Folhas sem bio. - Folhas sem bioestimulante aplicado; Repr. Com bio. – estruturas reprodutivas com bioestimulante aplicado; Repr. Sem Bio. – estruturas sem bioestimulante aplicado.

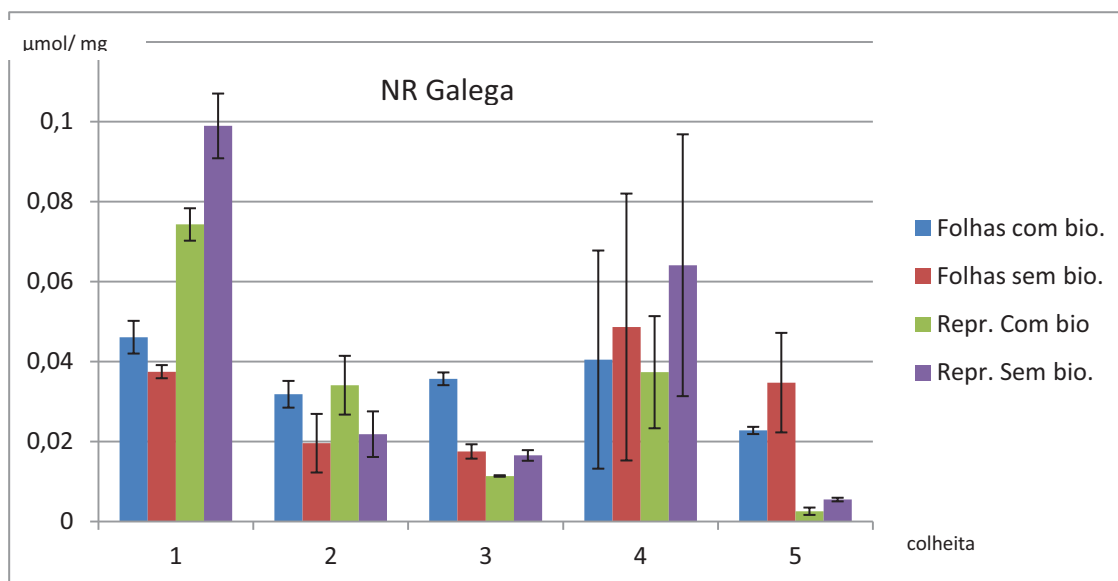


Figura 4 - Atividade média da enzima GS nos diferentes órgãos ao longo do período estudado para a cultivar Galega. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=3). Legenda: Folhas com bio. – folhas com bioestimulante aplicado; Folhas sem bio. – Folhas sem bioestimulante aplicado; Repr. Com bio. – estruturas reprodutivas com bioestimulante aplicado; Repr. Sem Bio. – estruturas sem bioestimulante aplicado.

